

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de Septiembre de 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/089571 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
A23L 3/3535, A01N 65/00, 41/08

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/000098

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de Marzo de 2004 (03.03.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
MOUSALA, S., L. [ES/ES]; Camino de Jayena, S/N Alhendin, E-18620 Granada (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
LARA-CAMBIL, Armando [ES/ES]; Camino de Jayena, S/N, E-18620 Alhendin Granada (ES). **GARCIA PAREJA, Pilar** [ES/ES]; Camino de Jayena, S/N Alhendin, E-18620 Granada (ES).

(74) Mandatario: **GONZALVEZ CRESPO, Carmen**; Avenida de Madrid, 85-Esc.C-1º, E-08028 Barcelona (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- con reivindicaciones modificadas

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: USE OF EXTRACTS AND COMPOUNDS OF ALLIUM-GENUS PLANTS AS PRESERVATIVES IN THE FOOD AND AGRI-FOOD INDUSTRIES

(54) Título: UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO ALLIUM COMO CONSERVANTES EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIA Y AGROALIMENTARIA

(57) Abstract: The invention relates to the use of extracts and compounds of Allium-genus plants as preservatives in the food and agri-food industries, both in food products and on the surface thereof, as part of a liquid or solid coating or incorporated in any type of capsule, as well as on plants during harvest or post-harvest. The compounds used are thiosulfonates, such as ajoene and vinylthiols and other products resulting from the decomposition of thiosulfonates.

(57) Resumen: Utilización de extractos y compuestos de plantas del género Allium como conservantes en las industrias alimentaria tanto en el interior de los alimentos como en su superficie, como parte de un recubrimiento líquido o sólido, o incorporados a cualquier tipo de encapsulamiento, así como en plantas en periodo de cosecha o postcosecha. Los compuestos empleados son tiosulfonatos, como el ajoeno y las viniltioldinas y otros productos resultantes de la descomposición de los tiosulfonatos

WO 2005/089571 A1

UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO ALLIUM COMO CONSERVANTES EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIA Y AGROALIMENTARIA

D E S C R I P C I Ó N

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente memoria descriptiva se refiere a la
utilización de extractos y compuestos de plantas del género
Allium como conservadores para la industria alimentaria y
agroalimentaria cuya finalidad es la de configurarse como una
alternativa natural al uso sistemático y abusivo de
15 determinados conservantes en los alimentos, tanto para el
hombre como para animales, y también como respuesta al uso
extensivo e intensivo de antimicrobianos no naturales en
agricultura, en especial en los tratamientos post-cosecha de
frutas, hortalizas y otros productos agroalimentarios.

20

CAMPO DE LA INVENCION

 Esta invención tiene su aplicación dentro de la
industria dedicada a la fabricación de productos conservadores
25 y aromáticos para la industria alimentaria y agroalimentaria,
especialmente productos conservadores de origen natural.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

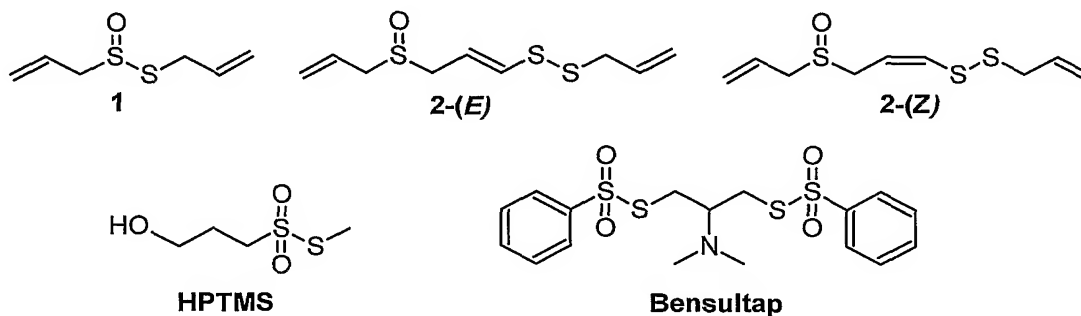
30 De todos es conocido el olor de las especies
pertenecientes a este género botánico, las mas conocidas son
el ajo (*Allium sativum* L.) y la cebolla (*Allium cepa* L.),
aunque otras menos conocidas, son también muy interesantes el
puerro (*Allium ampeloprasum* L. Var. *porrum*), chalota (*Allium*
35 *ascalonicum* auct.), ajo silvestre (*Allium ursinum* L.),

cebollino (*Allium schoenoprasum* L.), etc. Desde los tiempos más antiguos son conocidas estas plantas por su olor fuerte, sabor picante y efectos fisiológicos llamativos. En 1944, Cavallito y Bailey (1,2) descubrieron algunos de los
5 compuestos responsables de estas propiedades, aislaron del ajo alicina, (1, aliltiosulfinato de alilo) y demostraron que este compuesto y algunos de sus homólogos son responsables de la actividad antibacteriana del ajo (1,3), frente a cepas de microorganismos patógenos para el hombre; como resultado de
10 estas investigaciones publicaron una patente (4).

Investigaciones mucho más recientes han demostrado que estos productos, los tiosulfinatos, se descomponen y/o transforman en otros subproductos, como son los
15 thiosulfonatos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, etc., que a su vez poseen variedad de efectos biológicos al igual que los tiosulfinatos, como antitrombicos (5,6), antimicrobianos (7)(8), antioxidantes (9), insecticidas (10,11), etc. No obstante los trabajos e investigaciones acerca de la
20 aplicación en alimentos de estos compuestos como conservadores dentro de los alimentos es muy escasa o casi nula, y no existe referencia alguna al tratamiento antimicrobiano de alimentos susceptibles de contaminarse en su superficie por hongos o bacterias, como son los quesos, embutidos, alimentos frescos,
25 alimentos precocinados alimentos listos para servir, etc. Existe alguna referencia al uso de extractos de ajo para, en combinación con otros aceites esenciales, usarlo como insecticida y antifúngico en plantas (12) y de *Allium tuberosum rottler* para la conservación de alimentos y también
30 como fungicida para plantas (13). En ninguno de estos dos casos se alude a la aplicación del extracto en la superficie de alimentos, acompañado o no de recubrimientos alimentarios o comestibles, a fin de preservar la superficie del alimento libre de la acción de hongos y bacterias, como es el caso de
35 algunos tipos de alimentos precocinados, quesos, etc., o de

frutas, verduras y hortalizas en tratamientos postcosecha, a fin que éstos lleguen al consumidor en perfecto estado de consumo y con buena apariencia.

5 Asimismo, las referencias a su utilización como antimicrobianos en tratamientos agrícolas (en cosecha o postcosecha) son también muy escasas (con la salvedad antes mencionada) o nulas en algunos casos. En el caso de los tiosulfinatos naturales, o de alguno de sus productos de
10 descomposición, existen escasas referencias bibliográficas para su posible uso en agricultura. Por ejemplo, alicina (1) y ajoeno (2) fueron ensayados frente a algunas especies patógenas de vegetales *in vitro* (14). Existen referencias a la actividad antimicrobiana de los tiosulfonatos provenientes
15 de la descomposición de los tiosulfinatos (15) (16), así como de este mismo tipo de productos pero artificiales, como el hidroxipropiltiosulfonato de metilo (HPMTS) se usan para la conservación de pinturas, barnices y aguas de torres de refrigeración (17), otros con estas mismas propiedades están
20 en fase de experimentación (16). También tiene uso comercial otro tiosulfonato no natural, *bensultap*, como insecticida (10).



25 El uso de productos aislados de plantas del género *Allium*, como el ajo, la cebolla, la cebolleta, el puerro, etc., o de sus extractos como antimicrobianos en alimentos o su uso en agricultura (pre y postcosecha), no han sido hasta el momento bien estudiados.

Una faceta muy importante en la conservación de alimentos, es la contaminación superficial por hongos y bacterias. En alimentos curados, como el queso y los embutidos, es un auténtico problema. La legislación alimentaria europea intenta resolver esta problemática mediante el uso de conservantes (18) (19), como por ejemplo son el *ácido sórbico* (E-200) y sus sales (sal potásica E-202 y cálcica E-203), el *ácido benzóico* (E-210) y sus sales (sal sódica E-211, potásica E-212 y cálcica E-233), los "parabenes" (p-hidroxibenzoato de etilo E-214 y su sal sódica E-215, p-hidroxibenzoato de propilo E-216 y su sal sódica E-217, p-hidroxibenzoato de metilo E-218 y su sal sódica E-219), *ácido propiónico* (E-280) y sus sales (sal sódica E-281, potásica E-282 y cálcica E-283) y *pimaricina* (E-235, un antibiótico macrólido-poliénico). Todos estos ácidos orgánicos, fenoles y sus sales son de efectividad muy limitada, únicamente la *pimaricina* tiene una actividad antifúngica muy notable en comparación con los productos antes mencionados (ver TABLA-2). Sin duda el abuso del sorbato (y resto de ácidos orgánicos y sus sales) y sobre todo de los antibióticos como la *pimaricina*, plantea graves problemas tanto de toxicidad (como por ejemplo alergias) como de resistencia de los microorganismos a los antibióticos.

Por otra parte en la alimentación animal una de las vías para prevenir las enfermedades de los animales es la administración de antibióticos a través de los piensos, dichos antibióticos pueden pasar a la cadena de alimentación humana al ingerir los productos procedentes de éstos (leche, productos cárnicos, huevos, etc.), incrementando los problemas antes mencionados.

El tratamiento intensivo y extensivo de plaguicidas, la mayoría de ellos artificiales (20), en los cultivos (de cereales, frutas y hortalizas, etc.) y tratamientos

postcosecha, también suponen un riesgo para la salud humana y animal así como para el medio ambiente.

El uso de productos naturales, que además han sido consumidos habitualmente en nuestra dieta, por ser constitutivos de plantas usadas en la gastronomía tradicional, garantiza su inocuidad y además nulo impacto ambiental. Las plantas del género *Allium* han venido usándose en la cocina tradicional, al igual que en remedios curativos, durante milenios, tanto para hombres como para animales, demostrándose su efectividad, utilidad e inocuidad (21) (22). Por todo esto, estos productos representan una alternativa real y eficaz, como ahora veremos, al uso de conservantes tradicionales en la alimentación (como se menciona con anterioridad), una respuesta a los antibióticos en los piensos de la alimentación animal, y un remedio eficaz contra muchas de las plagas microbianas que azotan las cosechas y los productos de postrecolección.

El solicitante conoce la existencia de las Patentes de Invención JP8012570, JP62129224, WO9207575, KR2002057877, KO1020020048347, US2508745 y EP0945066, todas ellas relativas a invenciones en las cuales se utilizan productos naturales derivados del *Allium* o productos afines como conservantes naturales, sin que en ninguna se contemplen las características que se describen en la presente memoria.

Igualmente, el solicitante conoce la existencia de las Patentes de Invención UK2061987 y JP62263121, que al igual que las anteriores tiene una aplicación similar, estando destinada esta invención a la obtención de composiciones farmacéuticas basadas en productos similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Cavallito, C.J. and Bailey J.H.; Allicin, the

Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. "Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action". *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1950-1951 (1944).

[2] Cavallito, C.J., Buck, J.S. and Suter, C.M.; "Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. II. Determination of the Chemical Structure". *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1952-1954 (1944).

[3] Small, L.D., Bailey, J.H. and Cavallito, C.J.; "Alkyl Thiosulfinates". *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1710-1713 (1944).

[4] Cavallito, C.J. and Small, L.D. "Hydrocarbon Esters of Hydrocarbonylthiolsulfinic Acids and their Process of Preparation". *US Patent* 2,508,745 (1950).

[5] Apitz-Castro, R., Cabrera, S., Cruz, M.R., Ledezma, E. and Jain, M.K.; "Effect of Garlic Extract and Three Pure Components Isolated from it on Human Platelet Aggregation, Arachidonate Metabolism, Release Reaction and Platelet Ultrastructure". *Thromb. Res.*, **32**, 155- 169, (1983).

[6] Block, E., Ahmand, S., Catalfamo, J.L., Jain, M.K. and Apitz-Castro, R.; "Antithombic Organosulfur Compounds from Garlic: Structural, Mechamistics, and Synthetic Studies". *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7045-7055 (1986).

[7] Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushirogushi, T., Matsuura, H. and Nakagawa, S.; "Antifungal Activity of Ajoene Derived from Garlic". *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(3), 615-617, (1987).

[8] Kyung, K.H. and Lee, Y.C.; "Antimicrobial Activities and Sulfur Compounds Derived from S-alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxides in *Allium* and *Brassica*". *Food Rev. Int.*, **17**(2), 183-198, (2001).

[9] Yin, M. and Cheng, W.; "Antioxidant Activity of Several *Allium* Members". *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4097-4101 (1998).

[10] Carlos De Liñan Vicente. "Farmacología Vegetal" 3ª Edición. Ed. Ediciones Agrotécnicas, S.L. 2003.

[11] Auger, J.; Dugrabet, S.; Naudin, A.; Abo-Ghalia, A.; Pierre, D. and Thibout, E. "Potential of *Allium* allelochemicals for safe insect control". *IOBC wprs Bulletin*, **25** (9), 295 (2002).

[12] Hsu, H.J.; Chang, C.; Zhou, J. N.: "Natural Pesticide Containing Garlic". European Patent Application: EP 0945066A1 (1999)

[13] Jung, B.M.; Kim, S. Gi; Koo, J.M.; Lee, J. B. and Park, J. M. "*Allium tuberosum* rattler extract against feed putrefying fungus, plant pathogenic fungus and plant putrefying fungus and method of extraction of antimicrobial active component". Korean Patent Application nº KR1020020027573.

[14] Singh, U.P., Prithiviraj, B., Wagner, K.G. and Plank-Schumacher, K.; Effect of Ajoene, a constituent of Garlic (*Allium sativum*), on Powdery Mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). *J. Pl. Dis. Prot.*, **102**(2), 399-406 (1995).

[15] Small, L.D.; Bailey, J.H. and Cavallito, C.J. "Comparison of Some Properties of Thiosulfonates and Thiosulfinates". *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 3565-3566 (1949).

[16] A) Baerlocher, F.J.; Baerlocher, M.O.; Chaulk, C.L.; Langler, R.F. and MacQuarrie, S.L. "Antifungal Thiosulfonates: Potency with some Selectivity". *Aust. J. Chem.* **53**, 399-402 (2000). B) Auth Johnston, T. P.; Rueggeberg, W. H. C.; Block,

S. S. "Fungicidal Activity and Structure, Fungicidal Activity of Trichloromethyl Thiosulfonates". *J. Agric. Food. Chem.*, **5**, 672 (1957)

5 [17] CAS nº: 29803-57-4; US EPA PC code: 035604.

[18] Real Decreto 142/2002: "Lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios".

10

[19] Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo: "Aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes"; sus modificaciones en la Directiva 98/72/CE y en la Directiva 2001/5/CE.

15

[20] Carlos de Liñan, "Vademecum 2003 de Productos Fitosanitarios y Nutricionales". Ed. Ediciones Agrotécnicas, S.L.

20 [21] Block, E., "The Chemistry of Garlic and Onions". *Scientific American*, **252**, 114-119 (1985).

[22] Block, E., "The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur"
25 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 1135-1178 (1992).

[23] García Pareja M.P., García Pareja M., Lara Cambil A., París Villalta J., Ramos-Cormenzana A. "Investigaciones de antimicrobianos de plantas: compuestos constitutivos e
30 inducidos. XVII Congreso Nacional de Microbiología". F. Farmacia. Univ. Granada. Septiembre, 1999.

[24] Iberl, B., Winkler, G. and Knoblock, K., "Products of Allicin Transformation: Ajoenes and Dithiins, Characterization
35 and their Determination by HPLC". *Planta Medica*, **56**, 202-211

(1990).

- [25] Freeman, F. and Koder, Y., "Garlic Chemistry: Stability of S-(2-Propenyl) 2-Propene-1-sulfinothioate (Allicin) in Blood, Solvents and Simulated Physiological Fluids". *J. Agric. Food. Chem.*, **43**, 2332-2338 (1995).
- [26] Block, E., Naganathan, S., Putman, D. and Zhao, S. "Allium Chemistry: HPLC Analysis of Thiosulfonates from Onion, Garlic, Wild Garlic (Ramsoms), Leek, Scallion, Shallot, Elephant (Great-Headed) Garlic, Chive, and Chinese Chive. Uniquely High Allyl to Methyl Ratios in Some Garlic Samples". *J. Agric. Food. Chem.*, **40**, 2418-2430 (1992).
- [27] Kubec, R.; Kim, S.; McKeon, D.M. and Musah, R.A. "Isolation of *S*-*n*-Butylcystein Sulfoxide and Six *n*-Butyl-Containing Thiosulfonates from *Allium siculum*". *J. Nat. Prod.*, **65**, 960-964 (2002).
- [28] Fernández, J.Y; Salazar, J.A.; Chaires, L.; Jiménez, J.; Márquez, M. y Ramos, E.G. "Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación". *Avance y Perspectiva*, **21**, 313-319 (2002).
- [29] Jozsef Sze-Tli, "Cyclodextrin Complexes, Their Preparation, and Pharmaceutical Compositions Containing Them". UK Patent Application: GB2061987.
- [30] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separation with Moderate Resolution". *J. Org. Chem.*, **43**, 2923-2925 (1978).

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La utilización de extractos y compuestos de plantas del género *Allium* como conservadores para la industria alimentaria y agroalimentaria que la invención propone,

permite la obtención de conservadores en alimentación, humana y animal, tanto dentro de los alimentos como en su superficie, y también de su aplicación en agricultura, tanto en campo como en tratamientos post-cosecha.

5 De forma más concreta, la utilización de extractos y compuestos de plantas del género *Allium* como conservadores para la industria alimentaria y agroalimentaria objeto de la invención, está constituida a partir de la obtención de extractos del agua donde se maceran ajos, y donde se comprueba
10 su actividad antimicrobiana (23), ver TABLA-1. Los extractos hexánicos (**A1** y **A2**) y con n-butanol (**B1** y **B2**), resultaron ser muy interesantes comparados con los productos comerciales más potentes que se aplican en alimentación, como la *pimaricina* (TABLA-2), y la agricultura (TABLA-3). Podemos observar, que
15 el amplio espectro de acción antimicrobiano, bactericida y fungicida, de estos extractos (y de los productos que más adelante mencionamos en esta invención), los hacen interesantes para su aplicación:

20 1. *Dentro de los alimentos*, donde las únicas alternativas son el ácido propiónico y sus derivados, los ésteres del ácido parahidroxibenzóico y sus sales, el ácido sórbico y sus sales, etc., ninguno de ellos tiene la actividad antibacteriana y antifúngica demostrada por estos
25 extractos. Claros mercados de aplicación son los alimentos precocinados "listos para servir", que representan una cuota de mercado cada vez más amplia, sector lácteo, y además resultan ser ideales para los sectores más tradicionales como salsas, charcutería y en
30 preparados cárnicos diversos (frescos o cocidos).

2. *En la superficie de los alimentos*, resultan ser una alternativa eficaz al uso de la *pimaricina*, para evitar la contaminación superficial de los alimentos curados,
35 tanto por hongos como por bacterias. La contaminación

bacteriana es frecuente en quesos frescos, frente a este problema la pimaricina resulta ser completamente ineficaz (ver TABLA-2) al igual que los otros conservantes autorizados ya mencionados.

5 3. En tratamientos pre-cosecha (en campo) y post-cosecha son, como podemos ver comparando con la TABLA-3, una alternativa al uso de los fitosanitarios habituales, como son los azoles, tiabendazoles, etc. (nombres comerciales conocidos son por ejemplo: tiabendazol, procloraz, 10 imazalil) (20). Este campo de aplicación resulta ser de gran importancia, debido a la total ausencia de productos comerciales naturales, que combinen a la vez potencia y un amplio espectro antifúngico, como es el caso de estos extractos de ajo y de los productos que son objeto de 15 esta invención (comparar TABLAS-1 y 3).

4. En combinación con recubrimientos usados para alimentos (comestibles o no), pueden resultar sumamente útiles, porque además de conservar la superficie del alimento, 20 este recubrimiento: a) modula la liberación del conservante, b) hace su distribución homogénea en la superficie del alimento, que a veces es muy irregular, c) estabiliza estos productos y los hace más eficaces en el tiempo.

25 5. Como aromas, pues las propiedades aromáticas de estos compuestos son un plus, que permiten sustituir en todo o en parte el ajo, la cebolla, etc, o sus extractos y esencias, poco eficaces como antimicrobianos, de las 30 formulaciones de preparados para la industria alimentaria, permitiendo combinar el aroma característico de las plantas de este género botánico con su efectividad antimicrobiana.

12

Tabla 1

MICROORGANISMOS ENSAYADOS	MUESTRAS ENSAYADAS DE LOS EXTRACTOS DE AJO (1000ppm)			
	A1	A2	B1	B2
<i>Escheriquia coli</i> , CECT 515	9	9	14	18
<i>Bacillus cereus</i> , CECT 1178	23	24	24	28
<i>Penicillium sp.</i> , aislado de Queso	26	26	37	48
<i>Aspergillus terreus</i> , aislado del Ambiente	10	10	35	44

Datos expresados en mm del halo de inhibición

Tabla-2

MICROORGANISMOS ENSAYADOS	PIMARICINA (dosis en ppm)					
	1000	500	250	250	100	62.5
<i>Micrococcus luteus</i> , aislado de Salchichón	0	--	--	--	0	--
<i>Staphylococcus aureus</i> , aislado de Hamburguesa	0	0	0	0	--	0
<i>Streptococcus faecalis</i> , aislado de Salchichón	0	0	0	0	--	0
<i>Bacillus megaterium</i> , ATCC 33085	0	0	0	0	--	0
<i>Bacillus cereus</i> , CECT 1178	0	--	--	--	0	--
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i> , ATCC 13925	0	0	0	0	--	0
<i>Escherichia coli</i> , CECT 515	0	0	0	0	--	0
<i>Salmonella typhimurium</i> , ATCC 13311	0	0	0	0	--	0
<i>Proteus vulgaris</i> , ATCC 13315	0	0	0	0	--	0
<i>Candida albicans</i> , ATCC 10231	16	14	12	12	--	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , CECT 1324	26	--	--	--	26	--
<i>Pullularia pullulans</i> , CECT 2657	23	30	28	28	--	24
<i>Penicillium funiculosum</i> , CECT 2702	12	12	11	10	--	10
<i>Penicillium sp.</i> , aislado de Queso	26	--	--	--	24	--
<i>Aspergillus níger</i> , CECT 2700	20	20	19	19	--	19
<i>Aspergillus terreus</i> , aislado del ambiente de cámara de maduración de Queso	15	--	--	--	14	--
<i>Tricoderma viride</i> , CECT 2460	18	16	15	14	--	13

Datos expresados en mm del halo de inhibición.

-- Dosis no ensayada

5

10

Tabla-3

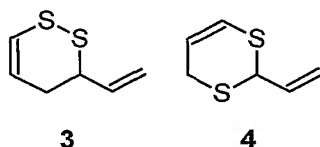
% Principio activo en producto comercial Dosis en ppm del producto comercial	Procloraz 40%			Tiabendazol 45%			Guazatina 20%			Imazalil 50%		
	4000	2000	1000	4000	2000	1000	4000	2000	1000	4000	2000	1000
MICROORGANISMOS ENSAYADOS												
<i>Penicillium Italicum</i> CECT 2294	35	35	31	>40	>40	>40	15	12	10	50	47	46
<i>Geotricum candidum</i> CECT 1902	0	0	0	0	0	0	35	30	27	26	23	20
<i>Tricoderma aureoviride</i> CECT 20102	12	11	8	26	26	24	35	30	25	31	25	20
Principio activo Dosis en ppm	o-Fenil fenol		Bifenilo		o-fenil fenato Na 30%							
	6000	4000	6000	4000	6000	4000	2000	1000	6000	4000	2000	1000
MICROORGANISMOS ENSAYADOS												
<i>Penicillium Italicum</i> CECT 2294	45	45	8	7	53	33	30	20				
<i>Geotricum candidum</i> CECT 1902	47	45	0	0	40	35	30	7				
<i>Tricoderma aureoviride</i> CECT 20102	42	40	0	0	35	20	10	0				
<i>Rhizopus stolonifer</i> CECT 2344	15	14	0	0	0	0	0	0				

Datos expresados en mm del halo de inhibición

5

10 Posteriormente nos planteamos como objetivo obtener los compuestos activos, bien de los extractos, o sintetizar los compuestos descritos en bibliografía con posible actividad biológica, encontrados en extractos de plantas del género *Allium*. Una vez obtenidos estos productos, comprobamos su actividad antimicrobiana, y cuales podrían ser las dosis de uso tanto para su aplicación dentro de alimentos como en superficie.

Nuestros primeros ensayos fueron con alicina y sus productos de degradación, ajoeno (2) y las vinil ditiinas: 3-vinil-4*H*-[1,2]-ditiina (3) y 2-vinil-4*H*-[1,3]-ditiina (4).
5 Estos se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos más adelante. Primero sintetizamos alicina y analizamos su potencial antimicrobiano frente a cepas de microorganismos aislados de alimentos, ver TABLA 4.



Una reacción mimética de la descomposición natural de la alicina es la descomposición o transformación mediante pirolisis de la misma. La extracción del producto de pirolisis
15 (C), primero con hexano y después con éter, nos rindió dos extractos: uno hexánico (D) rico en las vinil ditiinas 3 y 4, di-, trisulfuro de alilo, y otros polisulfuros de alilo, y otro etéreo (E), enriquecido en ajoeno. A todas estas fracciones les comprobamos su actividad frente a cepas
20 aisladas de alimentos, como podemos ver en la TABLA-5. Todos ellos poseen una extraordinaria actividad, por lo que procedimos a aislar los principios mayoritarios, ajoeno y vinil ditiinas, y a cada uno de éstos les comprobamos su actividad biológica frente a microorganismos aislados de
25 alimentos y típicos de contaminación post-cosecha de frutas, TABLA-6.

Tabla 4

Microorganismo ensayado	1		
	100ppm	50ppm	25ppm
<i>Micrococcus luteus</i> , aislado de Salchichón	32	25	19
<i>Bacillus megaterium</i> , ATCC 33085	34	27	23
<i>Bacillus cereus</i> , CECT 1178	35	29	22
<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC 15313	30	24	18
<i>Escherichia coli</i> , CECT 515	21	17	14
<i>Candida magnoliae</i> , aislado de Queso	38	30	22
<i>Candida krusei</i> , aislado de Queso	29	18	14
<i>Candida parapsilosis</i> , aislado de Queso	17	14	--
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , CECT 1324	44	32	28
<i>Penicillium sp.</i> , aislado de Queso	34	26	22
<i>Aspergillus terreus</i> , aislado del ambiente de cámara de maduración de Queso	25	22	12
<i>Aspergillus Níger</i> , CECT 2700	19	13	10

Datos expresados en mm del halo de inhibición

-- Dosis no ensayada

Tabla 5

Microorganismos	C (ppm)					D (ppm)					E (ppm)				
	1000	500	250	125	60	1000	500	250	125	60	1000	500	250	125	60
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	25	20	19	13	12	14	12	10	8	0	25	20	15	11	10
<i>Bacillus subtilis</i> Aislado de Pimentón	40	38	34	28	0	22	20	18	12	11	40	38	35	28	0
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 33085	50	50	44	32	22	27	24	20	18	16	42	38	33	26	0
<i>Bacillus cereus</i> CECT 1178	37	35	27	27	0	25	22	18	16	14	32	28	24	22	0
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	11	9	7	7	0	0	0	0	0	0	10	8	7	0	0
<i>Saccharomices cerevisiae</i> CECT 1324	24	21	14	11	9	18	17	14	10	9	27	22	16	12	11
<i>Candida krusei</i> Aislado de Queso	28	25	17	14	12	21	18	15	11	9	25	23	20	14	13
<i>Candida magnoliae</i> Aislado de Queso	35	30	21	15	13	24	19	13	10	9	33	25	21	16	14
<i>Penicillium sp</i> Aislado de Queso	35	25	17	9	7	30	25	18	13	7	34	27	19	13	9
<i>Aspergillus terreus</i> Aislado del ambiente de cámara de maduración de Queso	25	19	11	7	0	22	14	11	7	0	24	17	12	7	0
<i>Aspergillus Níger</i> CECT 2700	30	22	15	10	0	45	40	36	11	0	28	20	12	0	0
<i>Geotricum candidum</i> CECT 1902	21	17	14	11	10	21	19	15	12	10	21	18	15	12	10

Datos expresados en mm del halo de inhibición

Tabla 6												
Microorganismos	2 (ppm)				3 (ppm)				4 (ppm)			
	1000	500	250	125	1000	500	250	125	1000	500	250	125
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	30	20	18	16	0	0	0	0	10	8	7	0
<i>Bacillus subtilis</i> Aislado de Pimentón	62	54	40	36	12	10	9	8	15	13	10	7
<i>Bacillus cereus</i> CECT 1178	36	30	24	18	10	8	8	7	12	10	9	7
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	13	11	9	7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i> Aislado de Queso	42	38	32	26	10	8	7	0	12	10	10	7
<i>Penicillium sp</i> Aislado de Queso	40	40	27	12	10	7	6	0	12	10	8	0
<i>Penicillium italicum</i> CECT 2294	50	44	24	18	0	0	0	0	10	8	0	0
<i>Aspergillus terreus</i> Aislado del ambiente de cámara de maduración de Queso	40	32	21	18	0	0	0	0	7	6	0	0
<i>Aspergillus Níger</i> CECT 2700	27	24	13	11	14	10	7	0	15	10	7	7
<i>Geotrichum candidum</i> CECT 1902	34	26	20	14	0	0	0	0	15	10	7	7

Datos expresados en mm del halo de inhibición

Con los datos de actividad antimicrobiana, y determinadas las dosis de uso activo *in vitro*, procedimos a comprobar la estabilidad de los productos puros, que conocíamos de su inestabilidad, como es el caso de los tiosulfinatos, en diferentes preparados comerciales que podrían servir de soporte de estos productos para su aplicación en superficie o dentro de alimentos. Los tiosulfinatos son los productos del ajo más inestables, en su descomposición se producen a su vez otros subproductos (3), (24) y (25), como ajoenos, tiosulfonatos, sulfóxidos, sulfuros y polisulfuros. De los tiosulfinatos naturales, hemos usado como ejemplo el propiltiosulfinato de propilo (5), del que no existen referencias bibliográficas explícitas a su estabilidad en diferentes medios, ni de su actividad antimicrobiana frente a hongos y bacterias contaminantes de alimentos y plantas.

El propiltiosulfinato de propilo (5), abunda en la

cebolla, la cebolleta, puerro, chalote, etc. (26), y es de los thiosulfinatos menos estudiados. Posee una actividad antimicrobiana muy parecida a la alicina (comparar TABLA-4 y TABLA-7), que es de los tiosulfinatos el más antimicrobiano (3),

Tabla 7

Microorganismo ensayado		5					
		100ppm	50ppm	25ppm			
Alimentos	<i>Micrococcus luteus</i> , aislado de Salchichón	32	25	19			
	<i>Bacillus megaterium</i> , ATCC 1178	34	27	23			
	<i>Bacillus cereus</i> , CECT 1178	35	29	22			
	<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC 15313	30	24	18			
	<i>Escherichia coli</i> , CECT 515	21	17	14			
	<i>Candida magnoliae</i> , aislado de Queso	38	30	22			
	<i>Candida krusei</i> , aislado de Queso	29	18	14			
	<i>Candida parapsilosis</i> , aislado de Queso	17	14	--			
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , CECT 1324	44	32	28			
	<i>Penicillium sp.</i> , aislado de Queso	34	26	22			
	<i>Aspergillus terreus</i> , aislado ambiente cámara	25	22	12			
	<i>Aspergillus Níger</i> , CECT 2700	19	13	10			
Microorganismos Aislados de Frutas en tratamientos postcosecha	Microorganismo ensayados (Aislados de la superficie plátanos contaminados)	1000 ppm	500 ppm	250 ppm	125 ppm	60 ppm	30 ppm
	<i>Penicillium sp.</i> Cepa aislada nº1	20	18	15	11	0	0
	<i>Penicillium sp.</i> Cepa aislada nº2	25	25	15	0	0	0
	<i>Penicillium sp.</i> Cepa aislada nº3	17	15	13	10	0	0
	<i>Penicillium sp.</i> Cepa aislada nº4	25	23	20	13	11	0
	<i>Colletotrichum sp.</i> Cepa aislada nº1	43	43	40	30	20	10
	<i>Colletotrichum sp.</i> Cepa aislada nº2	45	48	47	35	30	20
	<i>Fusarium sp.</i> Cepa aislada nº1	35	25	25	15	0	0
	<i>Fusarium sp.</i> Cepa aislada nº2	20	20	15	12	10	0
	<i>Fusarium sp.</i> Cepa aislada nº3	33	30	15	0	0	0
	<i>Levadura</i> (sin identificar)	65	63	55	50	45	40

Datos expresados en mm del halo de inhibición

-- Dosis no ensayada

Hemos comprobado su estabilidad en diferentes soportes, algunos usados como recubrimientos (en alimentos y para tratamientos post-cosecha), como podemos ver en la TABLA-8 donde hemos puesto algunos posible soportes a modo de ejemplo, que comprenden dispersiones de polisacáridos y/o gomas alimentarias (goma xantana, goma arábica, almidones, etc.), emulsiones plásticas de acetato de polivinilo y

acrílicas, dispersiones y/o emulsiones de glicéridos y sucroésteres. Todos ellos con los conservantes habituales en alimentación como la pimaricina, sorbatos, parabanes, propionatos, ácido cítrico, ácido acético, etc. La estabilidad
 5 fue seguida durante un periodo de tiempo entre los 2 y 3 meses.

Tabla-8			
Medio/Soporte	ppm de PTS		%
Emulsión PVA	A	5000	67
	B	7500	71
	C	10400	67
Emulsión Acrílica (Mowilith® 7281)	A	5200	87
	B	7500	84
	C	10300	77
Dispersión de Sucroésteres 25%	A	5400	80
	B	7200	86
	C	10900	86
Emulsión de Gliceridos Acetilados, 50%	A	5100	72
	B	8000	91
	C	10300	81
Emulsión de Glicéridos acetilados, 30%	A	5200	90
	B	7900	91
	C	10800	93
Dispersión de Gomas Alimentarias	A	5000	88
	B	7800	91
	C	10200	90

Además, hemos comprobado que su efectividad apenas se ve mermada por la presencia del soporte, tal y como podemos
 10 ver en la TABLA-9, donde demostramos que la efectividad en una emulsión de acetato de polivinilo no se ve alterada, y resulta

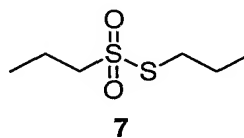
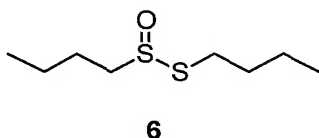
ser muy competitiva frente a los diversos conservantes habitualmente usados para estos recubrimientos de alimentos.

Tabla 9

MICROORGANISMO ENSAYADO	Emulsiones de Acetato de Polivinilo		
	5 5000ppm	5 10000ppm	Pimaricina 2000ppm
<i>Penicillium sp.</i> , aislado de Queso	25	29	18
<i>Aspergillus Niger</i> , CECT 2700	33	43	20
<i>Geotricum candidum</i> , CECT 1902	18	20	15
<i>Mucor plumbeus</i> , aislado de Queso	12	13	13

Datos expresados en mm del halo de inhibición

5 Como ejemplos también podemos incluir algunos otros derivados que conservan una extraordinaria actividad, como son: *n*-butiltiosulfinato de *n*-butilo (6) (27) y propiltiosulfonato de propilo (7), este último representa una serie de productos activos con la función orgánica
10 tiosulfonato, provenientes de la descomposición o transformación de los tiosulfinatos, y que mantiene una interesante actividad biológica, como podemos ver en la TABLA-10, muy semejante a 5 (comparar con la TABLA-7).



15

Tabla 10

Microorganismo Ensayado	6 1000ppm	7 1000ppm
<i>Bacillus subtilis</i> , aislado de Pimentón	60	65
<i>Staphylococcus aureus</i> , aislado de Hamburguesa	45	55
<i>Salmonella typhimurium</i> , ATCC 13311	20	31
<i>Penicillium italicum</i> , CECT 2294	67	65
<i>Mucor plumbeus</i> , aislado de Queso	17	13

Datos expresados en mm del halo de inhibición

De todo lo anteriormente mencionado podemos sugerir un rango de dosis de aplicación para estos productos, teniendo en
20 cuenta que debido a la potente actividad antimicrobiana que exhiben, podrían no sólo estar en dosis paliativas, frente a un determinado problema microbiológico, sino también disminuir

su presencia hasta dosis que podríamos considerar preventivas. No olvidemos, como hemos referido con anterioridad, que la efectividad antimicrobiana y las propiedades aromáticas de estos compuestos pueden ser complementarias. Sugerimos las
5 siguientes dosis de extracto y/o compuesto activo:

- Para el interior de un alimento, una dosis mínima de 1 a 5ppm, y máxima de 5% (p/p).

- 10
- Para tratamientos en superficie, en el producto a aplicar, dispersados en cualquier medio, o incluido en un recubrimiento: mínima de 10ppm, y máxima de 10% (p/p).

- 15
- Tratamientos agrícolas, dosis en el producto a aplicar en campo o postcosecha: mínima de 10ppm y máxima de 50% (p/p).

- 20
- Tratamientos de desinfección, dosis en el producto final para aplicar: mínima de 10ppm y máxima de 50% (p/p).

Un importante efecto conseguimos si, además de soportar estos productos usando un recubrimiento, los
25 *encapsulamos* usando diversos métodos (28), como en aceites, gomas alimentarias, etc. y *los añadimos al recubrimiento formando finalmente parte de él*. También el uso del encapsulado para el interior de los alimentos resulta ser muy útil, al igual que en la desinfección y tratamientos pre- y
30 postcosecha. Con la encapsulación conseguimos:

1. Estabilizar aún más los productos que resultan lábiles, siendo ahora estabilizados: a) al formar enlaces (por ejemplo, puentes de hidrógeno) con el soporte
35 encapsulador, evitando así reacciones intramoleculares, y

b) también inmovilizando la molécula aún si el soporte esta temporalmente en estado líquido, por ejemplo, fundido o en emulsiones, disoluciones y dispersiones, evitando en este caso reacciones intermoleculares. Consequir una mayor estabilidad, nos permite aumentar las posibilidades de campos y de condiciones de aplicación (temperaturas, pH, etc).

2. Modular la presencia de la materia activa en el alimento, recubrimiento, como agente desinfectante y en los tratamientos pre- y postcosecha en función de la demanda del antimicrobiano, quedando este en reserva hasta que la demanda lo libere debido a una contaminación biológica. Esto prolonga su eficacia mucho más en el tiempo y por tanto hace más eficaz la actividad antimicrobiana del recubrimiento.

Como ejemplo de agente encapsulante hemos utilizado los complejos formados con las *ciclodextrinas* naturales, α , β y γ . Estas ya han sido descritas como estabilizantes y moduladoras de la actividad antimicrobiana de la alicina (1) (29), la novedad en nuestro caso, es incorporar estos antimicrobianos encapsulados al recubrimiento alimentario y que queden formando parte de él, sobre el alimento. Como ejemplo, en este caso, hemos usado el producto 5 (propitiosulfinato de propilo), para formar los complejos de encapsulación con las *ciclodextrinas* naturales antes mencionas, hemos comprobado su actividad, tanto de los complejos tal cual (ver TABLA-11). Como podemos ver, y de acuerdo a lo encontrado en bibliografía para la alicina (29), la actividad antimicrobiana del producto no se ve alterada, al formar ninguno de los complejos con las *ciclodextrinas*. Las ligeras variaciones se justifican debido a la mayor o menor liberación del compuesto activo para cada tipo de complejo.

La efectividad de la encapsulación, y más concretamente formando complejos con ciclodextrinas, la podemos observar en el ejemplo de aplicación n°1.

Tabla 11

CEPAS ENSAYADAS	Complejo α -CD*		Complejo β -CD*		Complejo γ -CD*		5	
	250 [#]	125 [#]	250 [#]	125 [#]	250 [#]	125 [#]	250 [#]	125 [#]
<i>Staphylococcus aureus</i> Aislado de Hamburguesa	19	9	22	11	22	11	23	13
<i>Bacillus subtilis</i> Aislado de Pimentón	28	23	32	27	33	28	35	27
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	17	12	19	15	18	15	18	15
<i>Candida krusei</i> Aislado de Queso	33	27	37	32	36	33	38	33
<i>Penicillium sp.</i> Aislado de Queso	40	33	43	34	44	36	42	37
<i>Aspergillus Niger</i> CECT 2700	33	18	35	22	36	20	37	21
<i>Geotricum candidum</i> CECT 1902	40	33	40	35	42	37	41	35

Datos expresados en mm del halo de inhibición

* α -CD, β -CD y γ -CD se refieren a los complejos de 5, 10% (p/p), con α , β y γ -ciclodextrina respectivamente.

Son las concentraciones ppm, que en el caso de los complejos con ciclodextrinas se refiere, a las cantidades efectivas de 5.

5

Eficacia "in vivo" en el control biológico de Hongos en el tratamiento post-cosecha de cerezas, variedad "picota pico colorado".

10

A) ENSAYOS DE 5 (propiltiosulfinato de propilo)

Se realizaron ensayos con dos concentraciones de 5, 500 y 1000ppm, para el control de los hongos patógenos *Penicillium expansum* y *Monilia fructigena*.

15

En el caso de *Penicillium expansum*, los tratamientos de 5 a 500 y 1000ppm fueron eficaces para el control del desarrollo de las infecciones producidas por este hongo (FIGURA 1). Así desde las 48h hasta las 120h, los frutos tratados con 5 a 500ppm, fue de un 26% a un 14% inferior al control en los frutos inoculados con 16603 esporas/ μ l, de un

20

13% a un 20% inferior en los frutos inoculados con 1660 esporas/ μ l. Asimismo el desarrollo de las infecciones, desde las 72h hasta las 120h, fue de un 13 a un 20% inferior en los frutos tratados con **5** a 500ppm respecto al control a un nivel de inóculo de 166,03 esporas / μ l, y de un 13 a un 20% inferiores a un nivel de inóculos de 16,6 esporas / μ l. Los diámetros de las infecciones producidas por el desarrollo del hongo, en frutos inoculados a concentraciones de 1660 y 166 esporas / μ l y tratadas con **5** a 500 y 1000ppm presentaban un diámetro menor al control, ralentizando el desarrollo de las mismas.

Los ensayos realizados con **5** frente a *Monilia fructigena*, se realizaron a dosis de 500 y 1000ppm, ambos tratamientos resultaron ser muy eficaces para controlar el desarrollo de las infecciones producidas por este hongo, inhibiendo completamente el desarrollo del hongo en los tratamientos de **5** a 500ppm en frutos inoculados con 5 esporas / μ l y los tratamientos con 1000ppm en frutos inoculados con 50 esporas / μ l (FIGURA 2).

B) Ensayos de compatibilidad de **5** (propiltiosulfinato de propilo) con un recubrimiento para post-cosecha: "FOODCOAT DMC". (producto con derivados de ácido grasos como agente de recubrimiento de frutas y hortalizas).

Se realizaron ensayos con dos concentraciones de **5**, 500 y 1000ppm, combinado con FOODCOAT DMC a una concentración de 11g/l, frente al desarrollo de hongos patógenos *Penicillium expansum* y *Monilia fructigena*.

Los ensayos de **5**, a las dosis señaladas, combinado con FOODCOAT DMC, frente a *Penicillium expansum* fueron eficaces en el control de las infecciones producidas por este hongo, incrementándose la eficacia al aumentar la

concentración de **5** (FIGURA 3). Concretamente los ensayos de **5** a 500ppm con FOODCOAT DMC disminuyeron el desarrollo de *Penicillium*, desde las 48h hasta las 120h, entre un 33% a un 54% con respecto al control, cuando los frutos fueron
5 inoculados a concentración de 16603 esporas/ μ l, y disminuyeron entre un 7% a un 34% con respecto al control cuando los frutos fueron inoculados a concentraciones de 1660 esporas/ μ l. De la misma forma, los tratamientos con **5** a 500ppm y FOODCOAT DMC disminuyen, desde las 72 horas hasta las 120horas, el
10 desarrollo de *Penicillium* en un 26% cuando los frutos son inoculados a concentraciones de 166 esporas/ μ l, y disminuyen un 20% el desarrollo del hongo cuando la concentración del inóculo fue 16 esporas/ μ l. Por otra parte los diámetros de las infecciones producidas por el desarrollo del hongo, cuando los
15 frutos son inoculados a concentraciones de 16603 y 1660 esporas/ μ l, son inferiores que el control en las cerezas tratadas.

Los tratamientos combinados de **5** a 1000ppm y
20 FOODCOAT DMC disminuyen, desde las 48 hasta las 120 horas, el desarrollo de *Penicillium* respecto al control, entre un 33 y 67% en frutos inoculados con 16603 esporas/ μ l, y entre un 7 y 47% en frutos inoculados a concentraciones de 1660 esporas/ μ l. Asimismo disminuyen, entre las 72 y 120 horas, el desarrollo
25 de un 13 a un 40% cuando los frutos son inoculados a concentraciones de 166 esporas/ μ l, y disminuyen un 26% el desarrollo del hongo cuando la concentración del inóculo fue de 16 esporas/ μ l. Los diámetros de las infecciones producidas por el desarrollo del hongo, cuando los frutos son inoculados
30 a concentraciones de 166 esporas/ μ l, son inferiores que el control en las cerezas tratadas.

Los ensayos frente a *Monilia fructigena*, pese al escaso desarrollo de la enfermedad, son indicativos de la
35 eficacia del tratamiento combinado de **5** y FOODCOAT DMC en el

control del desarrollo de las infecciones por *Monilia*. En la FIGURA 4 podemos observar la completa inhibición del desarrollo de la enfermedad de ambos tratamientos a concentraciones de inoculación de 5 esporas/ μ l. Analizando los diámetros de las infecciones producidas durante el desarrollo del hongo nos encontramos que en los frutos inoculados con 500 esporas/ μ l, los diámetros de la heridas de las cerezas tratadas con 5 a 500 y 1000ppm con FOODCOAT DMC (11g/l), presentan un diámetro inferior al control.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un juego de planos, en los que con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura número 1.- Representa la evaluación de la infección por *Penicillium expansum* en el tratamiento *in vivo* con 5 contemplado en el objeto de la invención relativa a la utilización de extractos y compuestos de plantas del género *Allium* como conservadores para la industria alimentaria y agroalimentaria.

La figura número 2.- Refleja la evaluación de la infección por *Moniglia fructigena* en el tratamiento *in vivo* con 5.

La figura número 3.- Representa la evaluación de la infección por *Penicillium expansum* en el tratamiento *in vivo* con la combinación de 5 y FOODCOAT DMC.

La figura número 4.- Corresponde por último a la

evaluación de la infección por *Moniglia fructigena* en el tratamiento *in vivo* de 5 combinado con FOODCOAT DMC.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

5

Obtención de extractos

Los extractos pueden obtenerse de cualquiera de los métodos descritos en bibliografía, bien con disolventes orgánicos (1), (2), (5), (24), o mediante maceración en agua y posterior extracción con algún disolvente orgánico (27).

Trituramos 2kg de de Ajo, ya pelado, y los mezclamos con 2 litros de agua, dejando dicha mezcla en agitación (de 10min a 24horas), filtramos y recogemos el líquido que posteriormente extraemos primero con hexano y después con n-butanol, secamos los disolventes de extracción sobre Sulfato sódico anhidro, y evaporamos los disolventes. Obtenemos así un extracto hexánico (0.1 al 2% p/p), y otro alcohólico (0.5 al 5% p/p). No obstante también podemos fraccionar la extracción con disolventes de polaridad creciente, hexano, *terc*-butilmetil éter, acetato de etilo y finalmente n-butanol. Obteniendo extractos cuyos porcentajes podrían encontrarse entre, 0.08 al 1%, 0.04 al 0.5%, 0.01 al 0.6%, 0.1 al 1.2%, respectivamente.

Los extractos así obtenidos pueden aplicarse directamente añadiéndose en el interior de un alimento o en su superficie con algún soporte alimentario de los antes mencionados, o encapsulados convenientemente.

Obtención de tiosulfinatos.

Pueden obtenerse bien mediante extracción de extractos frescos de plantas del género *Allium* (1), (2), (14),

o bien mediante síntesis de acuerdo con los métodos descritos en bibliografía (1-4), (6), (24), (25), (27).

Ejemplo de preparación de alicina (**1**): Sometemos a vacío por debajo de 0.5mmHg y a temperatura ambiente a 82g de disulfuro de dialilo comercial, hasta haber eliminado el sulfuro de alilo que lo impurifica. Disolvemos en 700ml de cloroformo, en un matraz provisto de agitación, el producto restante, 69g, y la mezcla la enfriamos hasta alrededor de 0°C, en este punto, añadimos ácido peracético (35%), muy lentamente, y finalizada la adición, continuamos agitando unos 30min. En frío y manteniendo la agitación, añadimos 140g de carbonato sódico anhidro lentamente, finalizada la adición de éste dejamos agitando una hora, y filtramos. Tras evaporar el disolvente eliminamos los restos de ácido acético mediante evaporación a 0°C a menos de 0.5mmHg. Obtenemos finalmente 69.5g de alicina ~90% de pureza.

En cualquier caso el tiosulfinato obtenido, se cromatografía en columna sobre gel de sílice a 0°C, mediante cromatografía "flash" (30), o convencional con polaridades crecientes de mezclas hexano/*terc*-butil-metil éter.

La pureza de los compuestos así obtenidos fue comprobada mediante HPLC, RMN-¹H y ¹³C, y Espectrometría de Masas (inyección directa).

Pureza mínima de los patrones >98%. Conservados a -80°C.

Obtención de algunos de los productos de descomposición de alicina (1): Ajoeno (2) y vinilditiinas (3 y 4).

4.3g de **1**, se disuelven en una mezcla Acetona:Agua, 3:2 (v:v), y se ponen a reflujo de 15 min a 4 horas,

evaporamos el disolvente y el producto restante tras eliminar el agua es 4.3g de producto de pirolisis (**C**). 3.0g de **C**, se disuelven en 100ml de una mezcla metanol:agua, 1:1 (v/v), y se extrae con 5x25ml de hexano, obteniéndose tras evaporar 0.99g (**D**, 32%), y posteriormente con 4x25ml de cloruro de metileno, obteniéndose tras evaporar 2.1g (**E**, 67%). La posterior purificación mediante cromatografía líquida, rindió los productos **2,3** y **4**.

Sus estructuras y pureza fueron comprobadas usando los métodos descritos para la obtención de tiosulfinatos.

Obtención de algunos de los productos de descomposición del propiltiosulfinato de propilo: Propiltiosulfonato de propilo (7).

Obtenido mediante desproporción del propiltiosulfinato de propilo (**5**): 50.0g de **5**, se disuelven en 500ml de agua con un pH comprendido entre 1 y 12, mantenemos la temperatura entre 25 y 100°C durante un tiempo que puede oscilar entre 1minuto y 15días. Extraemos con cloruro de metileno y el producto resultante, se purifica mediante cromatografía líquida sobre gel de sílice obteniendo 35g de **7**.

Sus estructuras y pureza fueron comprobadas usando los métodos descritos para la obtención de tiosulfinatos.

Preparación de encapsulados de extractos y productos activos.

De entre los posible encapsulamientos (28) hemos puesto como ejemplo la formación de complejos con ciclodextrinas, el procedimiento ha sido idéntico al descrito en bibliografía (29). Como ejemplo explicamos a continuación la formación del complejo de β -ciclodextrina con **5**: Disolvemos en agua entre 40 y 95°C, sobre la cual burbujeamos argón, 227g

de β -ciclodextrina. Sobre esta disolución añadimos muy lentamente, con agitación, 35g de **5** disueltos en 80ml de etanol del 96%. Finalizada la adición, dejamos agitar durante 1 hora manteniendo la temperatura y posteriormente dejamos
5 enfriar a temperatura ambiente entre 4 y 12 horas, a continuación mantenemos la mezcla a 0°C durante 16horas. Filtramos y secamos en desecador sobre pentóxido de fosforo, obteniendo finalmente 238g de un polvo fino y cristalino, de
10 complejo con β -ciclodextrina, que contiene aproximadamente un 10% (p/p) en **5**.

Pruebas de actividad antimicrobiana.

Para evaluar la capacidad antimicrobiana hemos usado
15 la técnica de difusión en agar a partir de discos de celulosa de 6mm de diámetro impregnados con las distintas dosis de ensayo del principio activo.

Los grupos antimicrobianos ensayados han sido
20 escogidos intentando cubrir los principales géneros responsables de contaminación microbiana en la industria alimentaria y agroalimentaria.

La capacidad antibacteriana ha sido valorada frente
25 a suspensiones de 10^6 células/ml, preparadas a partir de cultivos puros jóvenes de cada una de las cepas a ensayar. El medio de cultivo utilizado ha sido Müller-Hinton (Merck)

La capacidad antifúngica ha sido valorada frente a
30 suspensiones de 10^8 esporas/ml, recogidas a partir de cultivos puros de los mohos seleccionados y frente a suspensiones de 10^7 células/ml para el caso de las levaduras. El medio de cultivo utilizado ha sido Sabouraud-glucosado 2% (Merck).

35 Tras incubar las placas de cultivo inoculadas con

los diferentes microorganismos, a las temperaturas correspondientes, se midieron los halos de inhibición microbiana aparecidos, dicha medida incluye los 6mm de diámetro de los discos de celulosa.

5

Pruebas de estabilidad sobre diferentes preparados de recubrimientos alimentarios comerciales.

Los productos activos fueron añadidos sobre
10 diferentes preparados comerciales de recubrimientos alimentarios en diferentes dosis y se mantuvieron en un rango de temperaturas entre 15 y 30°C, monitorizando la estabilidad mediante HPLC. Todos ellos contenían, o no, los conservantes habituales en alimentación como la pimaricina, sorbato de
15 potasio, p-hidroxibenzoatos de metilo y propilo, propionatos de sodio y calcio, ácido cítrico, ácido acético, etc., a fin de ver la estabilidad frente a éstos en el preparado comercial.

20 Algunos ejemplos de soportes utilizados:

⇒ Emulsiones O/W de Acetato de Polivinilo (PVA) y Acrílicas.

25 ⇒ Dispersiones de gomas alimentarias (Goma Xantana, goma arábiga, etc.) en agua.

⇒ Emulsiones O/W de derivados de ácidos grasos: Glicéridos, sucroésteres, etc.

30

Pruebas de aplicación con los preparados de recubrimientos alimentarios comerciales.

Estas fueron llevadas a cabo de acuerdo a las
35 instrucciones de aplicación de dichos preparados comerciales

sobre los alimentos por inmersión, tales como salchichón, chorizo, queso, etc. (ver ejemplos de aplicación), con diferentes dosis de producto antimicrobiano.

5 **Pruebas de aplicación con los productos antimicrobianos dentro de alimentos: Seguimiento de la calidad microbiológica y conservación de los alimentos.**

10 Las pruebas fueron realizadas en productos cárnicos tales como hamburguesas y salchicha fresca, en diferentes dosis, sin y con los conservantes habituales (sulfitos).

Se prepara cada muestra por quintuplicado y se realiza un control de calidad microbiológico en el tiempo, 15 realizándose un triplicado de cada muestra.

⇒ Los parámetros microbiológicos analizados han sido los siguientes:

- 20 ▪ Aerobios mesófilos totales
- Coliformes
- *schierichia coli*
- 25 ▪ *Salmonella* (presencia/ausencia en 25 g)

⇒ Dichos parámetros se han analizado a distintos tiempos:

- 30 ▪ 0 días
- 4 días
- 7 días
- 35

METODOLOGÍA:

A continuación se describe la metodología utilizada en el control de calidad microbiológica en el tiempo para los siguientes parámetros microbiológicos:

- Recuento de microorganismos aerobios mesófilos revivificables.
- 10 ▪ Investigación y recuento de enterobacterias lactosa - positivas (coliformes).
- Investigación y recuento de *Escherichia coli*.
- 15 ▪ Investigación de *Salmonella*.

RECUESTO DE AEROBIOS TOTALES MESOFILOS

El método utilizado para determinar el número de gérmenes por gramo ha sido el de recuento en placas, partiendo de una serie de diluciones decimales de la muestra y utilizando la técnica por siembra en superficie.

El medio de cultivo utilizado ha sido un agar nutritivo (P.C.A. de Merck) preparado sobre placas Petri, sobre el que a partir de la serie de diluciones decimales de la muestra (desde -1... hasta -6, en caldo triptona de soja ó TSB de Merck) se ha transferido 0.1 ml de cada una de las diluciones.

La Tª de incubación de las placas ha sido de 31±1°C.

EL resultado final se expresa como el recuento total de microorganismos por gramo de muestra (dicho recuento se

realiza en las diluciones en las que se detecten entre 30-300 colonias/placa).

INVESTIGACION Y RECuento DE ENTEROBACTERIAS LACTOSA-POSITIVAS
5 (COLIFORMES)

El método utilizado para la detección de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes) se basa en su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en presencia de sales biliares.

Para ello hemos realizado un recuento en medio líquido para determinación de un NMP sobre caldo lactosado biliado verde brillante (caldo Brila de Merck).

Dicho caldo Brila se prepara en una gradilla con 3 series de tres tubos por cada una de las muestras a analizar. Cada tubo contiene 10 ml de caldo Brila y 1 campanita Durham.

En cada uno de los tubos de la primera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:10 ó (-1).

En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:100 ó (-2).

En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:1000 ó (-3).

Se incuban las tres series a $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$, haciendo lectura a las 24 y 48 horas.

La reacción es positiva cuando se produce desprendimiento de gas en la campana Durham, por lo menos en 1/10 parte de su volumen.

Con el número de tubos positivos en cada serie, se

recurre a la tabla de número más probable (N M P) y se extrapola el dato.

Finalmente el resultado se expresa como el recuento de coliformes por gramo de la muestra.

INVESTIGACION Y RECUESTO DE *ESCHERICHIA COLI*

Se parte de los tubos positivos en Caldo Brila obtenidos en la investigación de coliformes, de acuerdo al siguiente protocolo:

Todos los tubos que presentan producción de gas se subcultivan con asa de siembra de nuevo sobre tubos conteniendo 10 ml de Caldo Brila (con campana Durham), llevándose a incubar a 44.5 °C durante 24-48 horas.

Transcurrida la incubación se presume la existencia de *Escherichia coli* en todo tubo con crecimiento y con formación de gas en las condiciones anteriores.

Como medio selectivo de confirmación se ha utilizado el agar eosina azul de metileno (EMB. Merck) aislando sobre placas conteniendo EMB a partir de todos los tubos positivos. La aparición de colonias que miden 2-3 mm de diámetro, (planas o ligeramente cóncavas), con centros oscuros casi negros, que ocupan las $\frac{3}{4}$ partes de la colonia, que con luz reflejada muestran a veces un brillo metálico verdoso, seguramente son *Escherichia coli* cuya confirmación se realiza mediante la prueba bioquímica del indol.

Cuando coincide crecimiento positivo (gas) en caldo Brila a 44.5°C, producción de indol y crecimiento característico sobre agar EMB, se hace la lectura en la tabla de NMP y se extrapola el dato.

El resultado se expresa como el número de *Escherichia coli* por gramo de muestra.

5 INVESTIGACION DE SALMONELLA

La sistemática analítica utilizada constó de tres etapas:

- 10 a) Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo.
- b) Enriquecimiento en medio líquido selectivo.
- c) Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos.

15

a) Pre-enriquecimiento no selectivo

El medio de elección es el agua de peptona tamponada.

20

Se pesan asépticamente 25 g del producto a analizar y se diluyen en 225 ml de agua de peptona tamponada para obtener una dilución al 1:10. Se mezcla bien y se lleva a incubar a 37°C durante 16-20 horas.

25

b) Enriquecimiento en medio líquido selectivo

Se agita el cultivo de pre-enriquecimiento y se toma con pipeta estéril 10 ml del mismo sembrándolo sobre 100 ml de caldo selenito-cistina (Merck) incubando a 37°C durante 18-24 horas.

30

c) Aislamiento diferencial sobre medios selectivos sólidos

35

A partir del cultivo obtenido en el medio líquido

selectivo, caldo selenito cistina, se siembra, por duplicado y sin recargar el asa en la segunda placa, sobre: Agar Haektoen (HE, Merck) , sobre Agar - xilosa - lisina - desoxicolato (XLD, Merck), Agar Rambach (Merck), Agar SS (Merck).

5

Se incuban en estufa a 37°C, todas las placas sembradas, durante 24-48 horas.

Se da como positivo el ensayo cuando se detectan las colonias típicas en al menos dos de los cuatro medios, que se confirman con pruebas bioquímicas complementarias.

Pruebas de eficacia de los productos antimicrobianos como agentes de Biocontrol de Enfermedades Fúngicas en Cerezas.

15 Materiales:

Cepas usadas: aisladas de la cereza.

Medio PDA para el aislamiento y cultivo de los hongos patógenos de cerezas (*Penicillium expansum* y *Monilia fructigena*)

20

Agua con Twenn 0.05%

Agua esteril

25

Producto antifúngico disuelto en agua estéril a 500 y 1000ppm, con y sin preparado de recubrimiento FOODCOAT DMC en base a derivados de ácido grasos (25%), en una dosis de 11g/l.

30 Patógenos:

Dos hongos patógenos de cerezas *Penicillium expansum* y *Monilia fructigena*, fueron obtenidos de frutos durante su conservación post-cosecha. La recogida de las esporas de los hongos, utilizadas para la inoculación de los frutos, se

35

realizó por inundación de la placa de cultivo de una semana de antigüedad con agua con tween 0.05% para resuspender las esporas de *Penicillium expansum*, o con agua para resuspender las esporas de *Monilia fructigena*. Posteriormente son
5 filtradas las suspensiones a través de gasas estériles. El recuento de esporas fue realizado con una cámara Thoma de recuento, para posteriormente ajustar las concentraciones a 16603 esporas/ μ l para *Penicillium expamsum* y 500 esporas/ μ l para *Monilia fructigena*. A partir de estas soluciones madre,
10 se realizaron cinco disoluciones sucesivas 1:10 de cada concentración.

Preparación del fruto e inoculación:

Tras el lavado y secado de las cerezas, se realizó
15 una incisión superficial de 2mm, con una aguja de siembra, en la cara opuesta a la cicatriz de sutura del fruto. Inmediatamente se inocularon 3 μ l de las suspensiones de esporas de hongos patógenos en las incisiones realizadas. Los frutos se conservan durante 24 horas en cámaras a 0°C para el
20 curado de la zona de incisión. Posteriormente son sumergidos durante 30 segundos en las suspensiones de los agentes de control biológico a ensayar. Finalmente los frutos son almacenados en cámaras a 20°C y diariamente se contabilizan el número de colonias desarrolladas y el tamaño de las mismas.

25

EJEMPLOS DE LA INVENCION

1.- Actividad conservadora sobre superficie de queso:

30 Incorporación de los compuestos o extractos en los recubrimientos alimentarios con base de emulsión de PVA para queso:

1.-A) Incorporación de 5 directamente sobre la emulsión:

35

Sobre emulsiones de 1Kg de PVA, se añaden las cantidades de PTS y pimaricina con sorbato potásico (entre 5000 y 15000ppm) tal y como aparecen en la tabla correspondiente. Dichos preparados se diluyen 1:1 con agua y se sumergen en ellos piezas de queso fresco sin tratamiento de superficie, envasado al vacío. Las piezas una vez secas se introducen cada una en un recipiente herméticamente cerrado y se dejan a temperatura ambiente. Realizamos un seguimiento de las mismas, observándose la aparición de moho en su superficie en los días aquí expuestos:

MUESTRA	Ppm de 5	ppm PIMARICINA	Aparición visible de moho a los
1	--	2000	10-15 días
2	5000	--	25-31 días
3	10000	--	≥31 días

Las cantidades de 5 añadidas a las emulsiones de PVA no alteran las propiedades fisicoquímicas ni filmógenas del film resultante una vez saca la emulsión.

1.-B) Incorporación de 5 formando parte de un complejo con α -ciclodextrina y β -ciclodextrina al 10% (p/p)

Sobre emulsiones de 1Kg de PVA, se añaden las cantidades de complejo en ciclodextrinas α (muestra 2) y β (muestra 3), de forma que la cantidad de producto activo, 5, es de 5000ppm, por otra parte preparamos una muestra (nº 1) con pimaricina (2000ppm) y sorbato potásico (entre 5000 y 15000ppm): Procedimos de igual manera que en el caso anterior al aplicar los productos, y realizamos un seguimiento de las muestras, observándose la aparición de moho en la superficie del queso de acuerdo a la tabla siguiente:

MUESTRA	ppm 5 en complejo	ppm PIMARICINA	Aparición visible de moho a los
1	--	2000	10-16 días
2	5000	--	28-31 días
3	5000	--	28-31 días

Las cantidades de los complejos de 5 con las ciclodextrinas no alteran las propiedades fisicoquímicas ni filmógenas del film resultante una vez saca la emulsión.

Como podemos ver la actividad de la pimaricina es semejante. En cambio el tiempo de conservación del queso ha sido ligeramente mayor o igual para los complejos con ciclodextrinas de 5, que cuando éste se agrega libre.

2.- Actividad conservadora sobre superficie de embutidos, tripas culares de chorizo y salchichón: Incorporación de los compuestos o extractos el recubrimiento alimentario con base de sucroésteres o diluido en agua.

Muestra 1: En primer lugar una serie de tripas cular de cerdo, se sumergen en una dispersión de pimaricina en agua, 500ppm, durante tres horas. Posteriormente se procede a embutir dos piezas de 600g cada una.

Posteriormente embutimos otras 6 piezas de 600g cada una y se tratan de la siguiente manera:

- Muestra control: Dos piezas se dejan sin tratamiento.
- Muestra 1: Con tripas sumergidas en una suspensión de pimaricina a 500ppm y posteriormente se embuten.
- Muestra 2: Dos se sumergen durante 2 minutos en una dispersión de sucroésteres en agua (10-40g/kg de agua),

con una concentración de 3000ppm de PTS.

Todas las piezas se someten a un estufaje entre 24 y 26°C, y 90% humedad relativa, durante 72 horas. Posteriormente se cuelgan y se dejan curar. Realizamos un seguimiento del aspecto externo y obtenemos los siguientes resultados:

Muestra	Aparición de moho a los:
Control	4-6 días
1	6 días
2	13 días

10 **3.-Actividad conservadora dentro de los alimentos de alicina (1): Hamburguesas y Salchicha fresca.**

Se preparan dos productos cárnicos crudos diferentes (salchichas y hamburguesas) que se tratan con diferentes dosis de alicina.

- 15
- Las dosis de ensayo utilizadas han sido: 25, 50 y 100 ppm.

Se prepara cada muestra por quintuplicado y se realiza un control de calidad microbiológico en el tiempo, realizándose un triplicado de cada muestra.

- 20
- Los parámetros microbiológicos analizados han sido los siguientes:

25

- o Aerobios mesófilos totales

- o Coliformes

30

- o *Escherichia coli*

- o *Salmonella* (presencia/ausencia en 25 g)

- Dichos parámetros se han analizado a distintos tiempos:

- o 0 días

5 o 4 días

- o 7 días

- 10 • Las referencias de las muestras quedaron de la siguiente forma:

Hamburguesa control: H-C

15 Hamburguesa tratada con 25 ppm de **1**: Lote 1/ H-1

Hamburguesa tratada con 50 ppm de **1**: Lote 2/ H-2

Hamburguesa tratada con 100 ppm de **1**: Lote 3/ H-3

20 Salchicha control: S-C

Salchicha tratada con 25 ppm de **1**: Lote 1/ S-1

25 Salchicha tratada con 50 ppm de **1**: Lote 2/ S-2

Salchicha tratada con 100 ppm de **1**: Lote 3/ S-3

30 Los resultados obtenidos en los ensayos especificados se muestran en las tablas adjuntas.

35 En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis microbiológico inicial preparación de hamburguesas y salchichas, respectivamente, con su distintas dosis de tratamiento (es decir a t=0 días).

En las tablas 14 y 15, aparecen los datos de los resultados obtenidos en el análisis microbiológico realizado tras 4 días de la preparación y tratamiento de dichas muestras de hamburguesas y salchichas respectivamente.

5

Tabla 12 t=0días	Aerobios totales Ufc/g	Coliformes Ufc/g	<i>Escherichia coli</i> ufc/g	<i>Salmonella</i> (en 25 g)
Control H-C	$3,43 \times 10^6$	150	23	presencia
Lote 1 H-1	$2,17 \times 10^6$	150	23	presencia
Lote 2 H-2	$9,01 \times 10^5$	150	23	presencia
Lote 3 H-3	$4,08 \times 10^5$	150	23	presencia

10

Tabla 13 t=0días	Aerobios totales ufc/g	Coliformes Ufc/g	<i>Escherichia coli</i> ufc/g	<i>Salmonella</i> (en 25 g)
Control S-C	$3,55 \times 10^5$	4	3	ausencia
Lote 1 S-1	$2,24 \times 10^5$	3	<3	ausencia
Lote 2 S-2	$8,99 \times 10^4$	<3	<3	ausencia
Lote 3 S-3	$6,06 \times 10^4$	<3	<3	ausencia

Tabla 14 T=4días	Aerobios totales ufc/g	Coliformes ufc/g	<i>Escherichia coli</i> ufc/g	<i>Salmonella</i> (en 25 g)
Control H-C	2,73x10 ⁸	>2400	1100	presencia
Lote 1 H-1	1,56x10 ⁸	>2400	150	presencia
Lote 2 H-2	6,23x10 ⁷	1100	150	presencia
Lote 3 H-3	3,17x10 ⁷	150	43	presencia

Tabla 15 t=4 días	Aerobios totales ufc/g	Coliformes Ufc/g	<i>Escherichia coli</i> ufc/g	<i>Salmonella</i> (en 25 g)
Control S-C	3,27x10 ⁶	240	11	presencia
Lote 1 S-1	3,08x10 ⁶	21	4	presencia
Lote 2 S-2	2,72x10 ⁶	7	4	presencia
Lote 3 S-3	3,10x10 ⁵	<3	<3	presencia

5 La calidad microbiológica inicial detectada en las hamburguesas, en cuanto a todos los parámetros microbiológicos analizados fue más desfavorable que la de las salchichas, detectándose incluso la presencia de *Salmonella* a tiempo 0.

10 En cuanto a la eficacia sobre los diferentes grupos

microbianos analizados, se puede deducir que las tres dosis utilizadas reducen en mayor o menor grado los recuentos obtenidos sobre dichos grupos.

5 Para el caso de los aerobios mesófilos totales y para la dosis de 100 ppm se consigue una reducción de una unidad logarítmica tanto para todas las muestras de salchichas como para el caso de hamburguesas, respectivamente a sus controles sin tratar. Dicha reducción se mantiene en el tiempo
10 (ver evolución en el tiempo de 0 a 4 días). La dosis de 50 ppm también tiene cierto grado de efectividad, siendo menos significativa la reducción conseguida por 25 ppm del principio activo.

15 En relación a la reducción conseguida para el grupo de los coliformes, también es significativa prácticamente para las tres dosis ensayadas. Dicha reducción y para el caso de hamburguesas inicialmente no se manifiesta, para posteriormente hacerse patente a los 4 días. Para el caso de
20 las salchichas desde el primer momento se detectan diferencias que igualmente se definen más patentes en el transcurso del tiempo.

 La reducción provocada por el producto ensayado
25 sobre los coliformes, se vuelve a corroborar específicamente con *Escherichia coli*.

 Por otra parte y en relación a *Salmonella*. Inicialmente no se detectó para el caso de salchicha pero sí
30 en hamburguesa. Las dosis de 50 y 100 ppm consiguen inhibir el crecimiento de *Salmonella*.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Utilización de extractos y compuestos de plantas
5 del género Allium como conservadores para la industria
alimentaria y agroalimentaria aplicables como antimicrobianos
como conservadores de alimentos para hombres y animales, tanto
dentro de éstos como, muy especialmente, en la superficie de
10 los mismos, tratamiento de plantas en cosecha y tratamientos
post-cosecha y desinfección ambiental en la industria
alimentaria, agroalimentaria y en todo tipo de instalaciones,
caracterizado por utilizar Thiosulfinatos en general, Ajoeno
constituido por una mezcla de isómeros E y Z o de cada uno de
15 ellos por separado, Thiosulfonatos en general, Vinil ditiinas
y productos resultantes de la descomposición o transformación
de los tiosulfinatos, tanto en lo relativo a los productos
aislados como a la mezcla resultante o diferentes
fraccionamientos de la misma, usando de partida para la
descomposición o transformación, tiosulfinatos puros o mezclas
20 de ellos, éstos disueltos en algún disolvente o mezcla de
disolventes de cualquier tipo (orgánico, inorgánico y/o agua),
y en cualquier tipo de condiciones, bien de temperatura, o de
concentraciones, presión, pH, etc, y cualquiera que sea el
tiempo que dure o se mantenga la transformación o
25 descomposición.

2.- Utilización de extractos y compuestos de plantas
del género Allium como conservadores para la industria
alimentaria y agroalimentaria, según la primera
30 reivindicación, caracterizado por permitir su aplicación
estando incluidos dentro de recubrimientos de cualquier tipo.
Pudiendo estar estos recubrimientos inicialmente en forma
líquida, para su aplicación como preparados líquidos, como son
las emulsiones, suspensiones, dispersiones o en disoluciones,
35 o bien tratarse de recubrimientos sólidos de cualquier clase,

cuya finalidad sea envolver o estar en contacto con alimentos, como por ejemplo pudieran ser el polietileno, polipropileno, papel, ceras (naturales o no), etc.

5 3.- Utilización de extractos y compuestos de plantas del género Allium como conservadores para la industria alimentaria y agroalimentaria, según la primera reivindicación, caracterizado porque los extractos y/o
10 encapsulamiento, y la incorporación de este encapsulado, a su vez, bien dentro del alimento, o en su superficie, o bien incorporado en un recubrimiento según la reivindicación 2.

15 4.-Utilización de los compuestos de las plantas del género Allium como aromas o aromatizantes en la industria alimentaria o agroalimentaria, según la primera reivindicación, y su aplicación, en el interior de un alimento, en su superficie, incluidos en recubrimientos o encapsulados de acuerdo a las reivindicaciones 2 y 3.

20

25

30

35

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

[recibidas por la Oficina Internacional el 10 de Noviembre de 2004 (10.11.04):

[reivindicaciones 1-4 reemplazadas por las reivindicaciones 1-3 modificadas]

1.- Utilización de extractos y compuestos de plantas del género *Allium* como conservadores para la industria alimentaria y agroalimentaria, de los destinados a ser utilizados como conservadores antimicrobianos para la industria alimentaria y agroalimentaria, en los alimentos destinados para ser consumidos por hombres y animales, tanto dentro de éstos, como muy especialmente en la superficie de los mismos, así como el tratamiento de plantas en cosecha y tratamientos postcosecha de productos agrícolas como frutas, hortalizas, semillas, etc., y para desinfección de instalaciones, equipos y ambiente, especialmente en la industria alimentaria y agroalimentaria, empleando compuestos de plantas del género *Allium* tiosulfinatos en general, 3-vinil-4H-1,2-ditiina y 2-vinil-4H-1,3-ditiina, utilizando un compuesto del Ajoeno, constituido por una mezcla de isómeros *E* y *Z* o de cada uno de ellos por separado, como conservador antimicrobiano para la industria alimentaria y agroalimentaria, en los alimentos destinados para ser consumidos por hombres y/o animales, tanto dentro de éstos, como muy especialmente en la superficie de los mismos, así como en tratamientos postcosecha de productos agrícolas como frutas, hortalizas, semillas, etc., y para desinfección de instalaciones, equipos y ambiente, especialmente en la industria alimentaria, agroalimentaria, así como por el empleo de las mezclas de productos resultantes de la descomposición o transformación de los tiosulfinatos, así como las diferentes fraccionamientos de las mismas, como conservadores antimicrobianos de los alimentos destinados para ser consumidos por hombres y animales, tanto dentro de éstos, como muy especialmente en la superficie de los mismos, así como el tratamiento de plantas en cosecha y tratamientos postcosecha de productos agrícolas como frutas, hortalizas, semillas, etc., y para desinfección de instalaciones, equipos y ambiente, especialmente en la industria alimentaria, agroalimentaria.

Usando como productos de partida para fabricar dichas mezclas de productos los tiosulfinatos puros o mezclas de ellos, éstos disueltos en algún disolvente o mezcla de disolventes de cualquier tipo (orgánico, inorgánico y/o agua), y en cualquier
5 tipo de condiciones para producir la descomposición, bien de temperaturas, o de concentraciones, presión, pH, etc., y cualquiera que sea el tiempo que dure o se mantenga la transformación o descomposición y el empleo de los extractos de plantas del género *Allium* en tratamientos postcosecha de
10 productos agrícolas como frutas, hortalizas, semillas, etc., y para desinfección de instalaciones, equipos y ambiente, especialmente en la industria alimentaria, agroalimentaria, **caracterizada** por permitir su aplicación dentro del campo de los recubrimientos de cualquier tipo, con independencia de que
15 inicialmente presenten una forma líquida, para su aplicación como preparados líquidos, como son las emulsiones, suspensiones, dispersiones o en disoluciones, o bien tratarse de recubrimientos sólidos de cualquier clase, cuya finalidad sea envolver o estar en contacto con alimentos, como por
20 ejemplo pudieran ser el polietileno, polipropileno, papel, ceras (naturales o no), etc.

2.- Utilización de extractos y compuestos de plantas del género *Allium* como conservadores antimicrobianos para la
25 industria alimentaria y agroalimentaria, de acuerdo con los campos de aplicación mencionados en el primer apartado de la primera reivindicación, caracterizado porque los extractos y/o compuestos pueden estar incorporados en cualquier tipo de encapsulamiento, y la incorporación de este encapsulado, a su
30 vez, bien dentro del alimento, o en su superficie, o bien incorporado en un recubrimiento según la reivindicación 2.

3.-Utilización de los compuestos de las plantas del género *Allium* como aromas o aromatizantes en la industria
35 alimentaria o agroalimentaria, de acuerdo con los campos de

aplicación mencionados en el primer apartado de la primera reivindicación, en el interior de un alimento, en su superficie, incluidos en recubrimientos o encapsulados de acuerdo a la reivindicación 2.

5

10

15

20

25

30

35

1/4

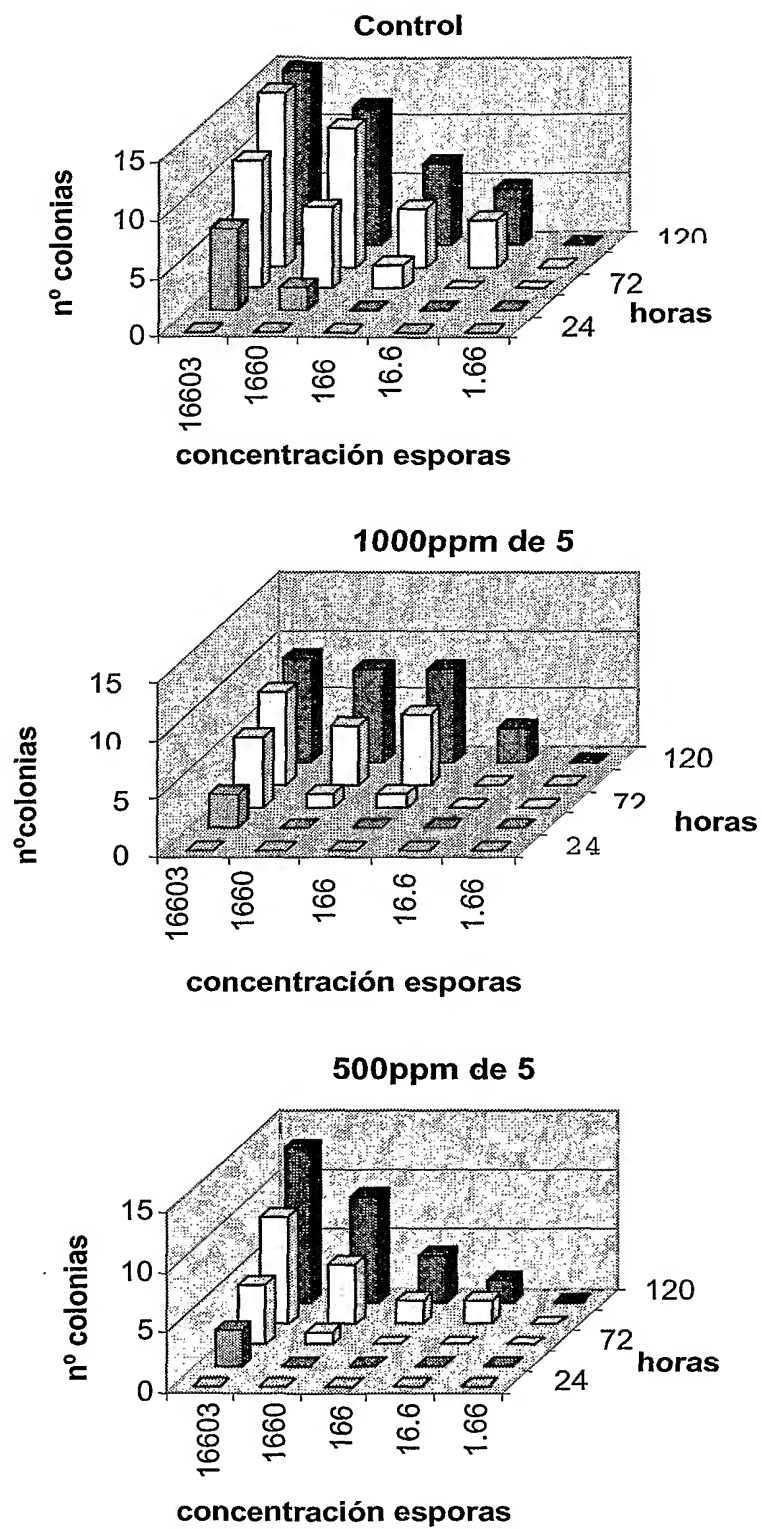
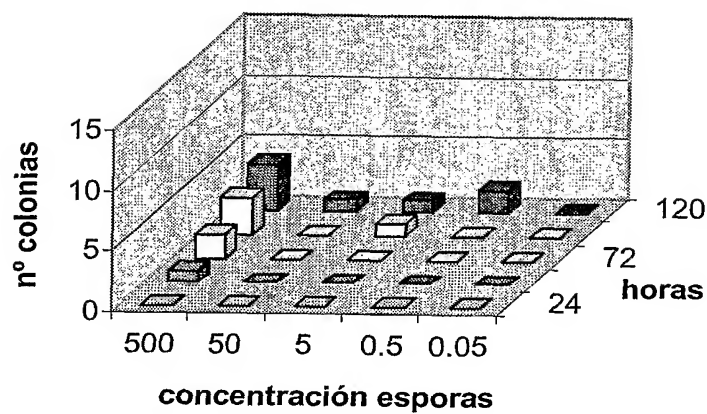


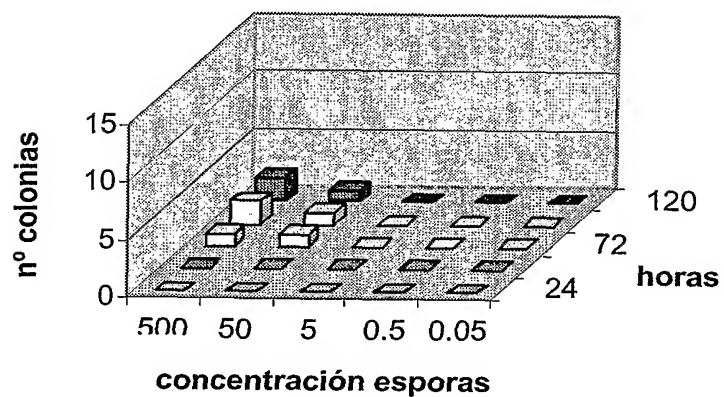
FIG. 1

2/4

Control



500ppm de 5



1000ppm de 5

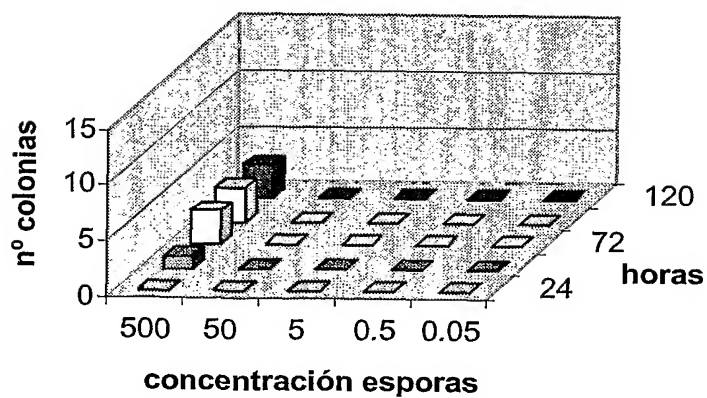
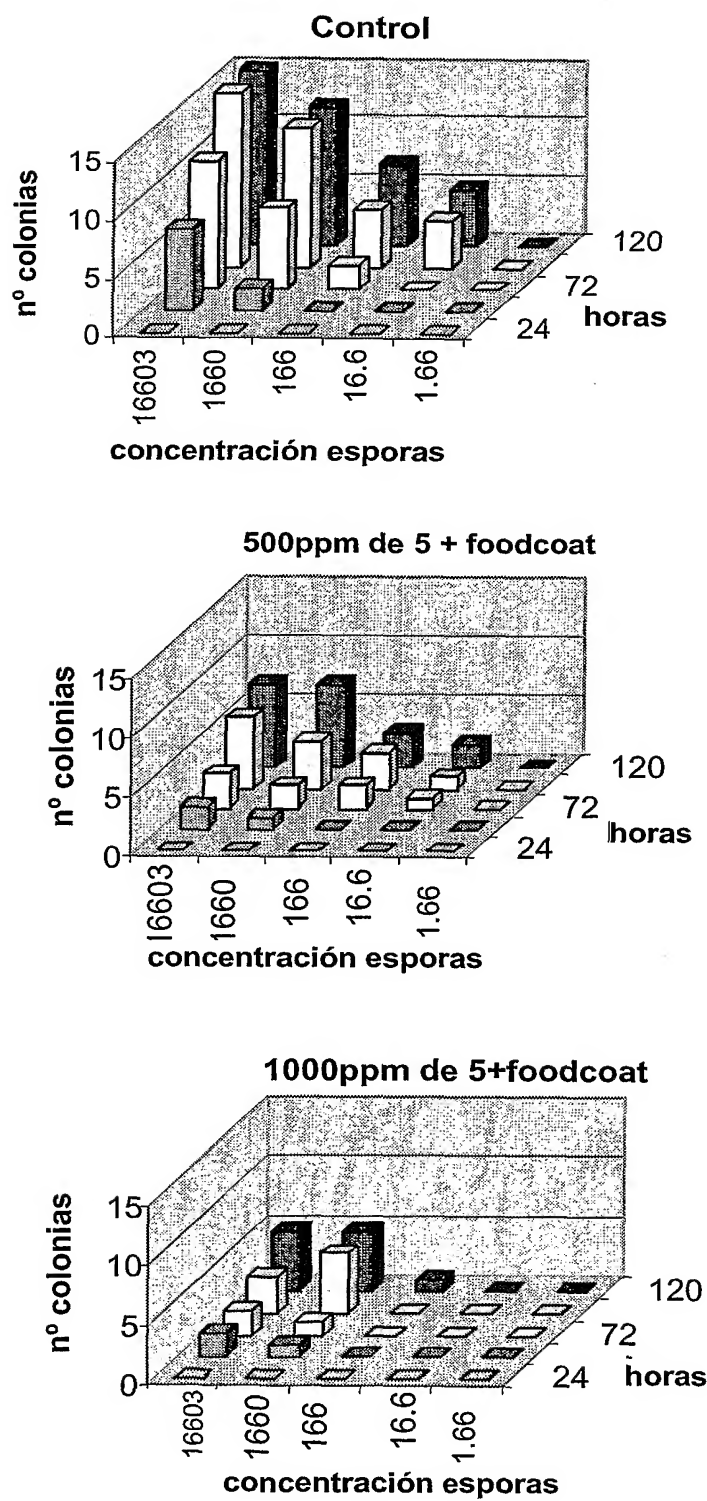


FIG. 2

3/4



4/4

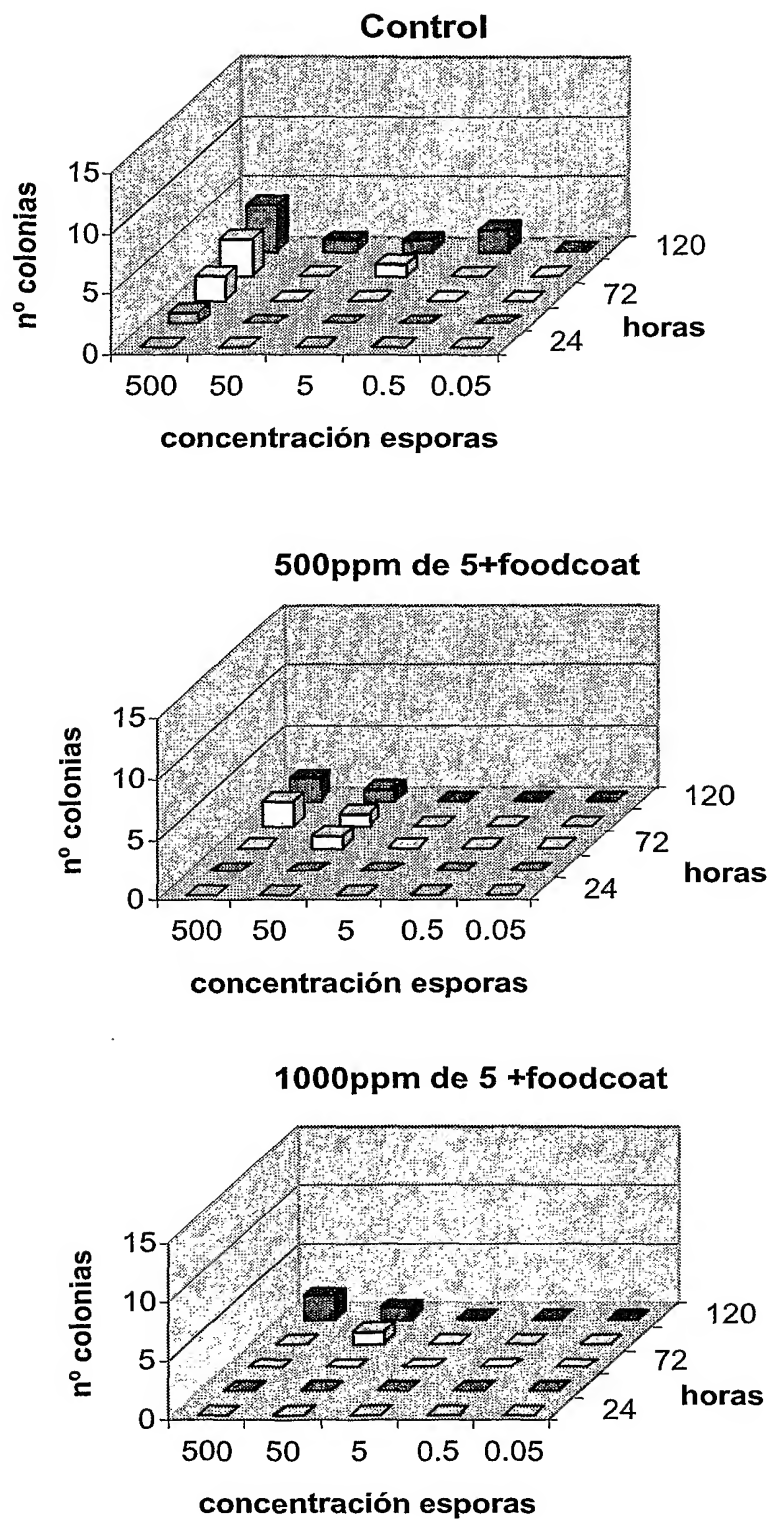


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 A23L 3/3535, A01N 65/00, 41/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 A23L 3/3535, 3/3544, 3/3499, 1/226, A01N 41/08, 65/00, 43/32		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, FSTA, AGRICOLA, HCAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 6016514 A (ISHIKAWAJIMA HARIMA HEAVY IND CO. LTD.) 25.01.1994. From PAJ (Patent Abstracts of Japan) en EPOQUE. Database abstract	1 3
A	GB 2061987 A (CHINOIN GYOGYSZER et al.) 20.05.1981. Claims 1-5, 16	1,3
X	FR 2779615A1 (JOLY GILLES GERARD NORBERT et al.) 17.12.1999; Claims 1-2	1
X	SINGH, U.P., PANDEY, V.N. et al "Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (Allium sativum)" Can J: Bot. 1990, 68(6) pp 1354-1356. ISSN 0008-4026;	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 April 2004 (20.04.04)		26 May 2004 (26.05.04)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000098

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEI-CHIN YIN et al. "Inhibitory effect of seven Allium plants upon three Aspergillus species" Intl J. Food Microbiology 49 (1999) pp 49-56. .	1
A	JP 62263121 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK)16.11.1987. From WPI (WORLD PATENT INDEX) Derwent Publications Ltd. n° de acceso 1987-359737[25] DW 198751. Database abstract	1
A	KR 2002057877 A (GENEBIOTECH CO LTD) 12.07.2002. From WPI. NA 2003-117772 [11]DW 200311. Database abstract	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000098

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP6016514 A	25.01.1994	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
GB 2061987 AB	20.05.1981	NO 794044 A	13.06.1980
		DK 526779 A	13.06.1980
		DE 2948869 AC	03.07.1980
		FR 2444060 AB	11.07.1980
		JP 55115866 A	06.09.1980
		JP 1002105 B	13.01.1989
		JP 1521247 C	29.09.1989
		AT 782979 A	15.01.1981
		HU 177081 B	28.07.1981
		AT 363492 B	10.08.1981
		SU 938732 A	23.06.1982
		YU 299079 A	30.06.1983
		CH 642347 A	13.04.1984
-----	-----	-----	-----
FR2779615 A	17.12.1999	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
JP62263121 A	16.11.1987	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
KR2002057877 A	12.07.2002	NONE	-----
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2004/000098

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A23L 3/3535, A01N 65/00, 41/08

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A23L 3/3535, 3/3544, 3/3499, 1/226, A01N 41/08, 65/00, 43/32

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, FSTA, AGRICOLA, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X A	JP 6016514 A (ISHIKAWAJIMA HARIMA HEAVY IND CO. LTD.) 25.01.1994. Recuperado de de PAJ (Patent Abstracts of Japan) en EPOQUE. Resumen de la Base de Datos.	1 3
A	GB 2061987 A (CHINOIN GYOGYSZER et al.) 20.05.1981. Reivindicaciones 1-5, 16.	1,3
X	FR 2779615A1 (JOLY GILLES GERARD NORBERT et al.) 17.12.1999; Reivindicaciones 1-2.	1
X	SINGH, U.P., PANDEY, V.N. et al "Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (Allium sativum)" Can J. Bot, 1990, 68(6) pp 1354-1356. ISSN 0008-4026.	1

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
20 Abril 2004 (20.04.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
26 MAY 2004 26.05.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Funcionario autorizado
I. Galíndez Labrador

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 3495595

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 2004/000098

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	MEI-CHIN YIN et al. "Inhibitory effect of seven Allium plants upon three Aspergillus species" Intl J. Food Microbiology 49 (1999) pp 49-56.	1
A	JP 62263121 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK)16.11.1987. Recuperado de WPI (WORLD PATENT INDEX) Derwent Publications Ltd. n° de acceso 1987-359737[25] DW 198751. Resumen de la Base de Datos.	1
A	KR 2002057877 A (GENEBIOTECH CO LTD) 12.07.2002. Recuperado de WPI. NA 2003-117772 [11]DW 200311. Resumen de la Base de Datos.	1

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solid _ nternacional n°

PCT/ ES 2004/000098

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
JP6016514 A	25.01.1994	NINGUNO	-----
GB 2061987 AB	20.05.1981	NO 794044 A DK 526779 A DE 2948869 AC FR 2444060 AB JP 55115866 A JP 1002105 B JP 1521247 C AT 782979 A HU 177081 B AT 363492 B SU 938732 A YU 299079 A CH 642347 A	13.06.1980 13.06.1980 03.07.1980 11.07.1980 06.09.1980 13.01.1989 29.09.1989 15.01.1981 28.07.1981 10.08.1981 23.06.1982 30.06.1983 13.04.1984
FR2779615 A	17.12.1999	NINGUNO	-----
JP62263121 A	16.11.1987	NINGUNO	-----
KR2002057877 A	12.07.2002	NINGUNO	-----